Sanquin Reagents
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: 31.20.512.3599
Fax: 31.20.512.3570
reagents@sanquin.nl
www.sanquinreagents.com

Exclusivamente para uso profissional

No. 060 010112

Cellbind Screen REF K7000 CE

Teste de microcoluna, para a detecção ou identificação de eritrócitos, bem como para a tipagem de sangue

Informação geral

O ensaio com Cellbind Screen é um sistema de teste de microcoluna, no qual os eritrócitos sensibilizados duma suspensão são capturados por uma matriz de gel que contém anti-IgG, anti-IgM e anti-C3d, num meio incentivante de alta densidade. Cada cartão-filtro consiste em seis microcolunas contendo o gel num meio de alta densidade. O Cellbind Screen destina-se a ser utilizado na detecção ou identificação de anticorpos eritrocitários, bem como para a tipagem de sangue, tipagem cruzada e para o teste directo de antiglobulina modificado (TDA, para a detecção da cobertura *in vivo* de eritrócitos com anticorpos e componentes de complemento). O Cellbind Screen é adequado para ser utilizado em sistemas manuais, automáticos e semiautomáticos. O ensaio com Cellbind Screen preenche os requisitos dos padrões e directrizes aplicáveis. As características de desempenho encontram-se mencionadas nos documentos de autorização, que, a pedido, são fornecidos com o produto. O teste baseia-se na imunofixação de eritrócitos sensibilizados numa microcoluna que contém uma matriz de gel. Adiciona-se a suspensão de células ao compartimento de incubação da microcoluna, juntamente com o plasma, o soro ou o reagente da tipagem sanguínea a ser testada. Durante a fase de incubação, os eritrócitos antigénio positivos ligar-se-ão aos respectivos anticorpos anti-eritrocitários, presentes no plasma, no soro ou no reagente. A seguir, os cartões são submetidos a três fases de centrifugação. Na primeira fase, o meio de elevada densidade irá provocar a separação dos eritrócitos do plasma, do soro ou do reagente. Na segunda fase, os eritrócitos sensibilizados serão aglutinados e capturados no topo da matriz de gel na microcoluna, enquanto na terceira fase os eritrócitos não sensibilizados e muito fracamente sensibilizados irão dirigir-se para o fundo da microcoluna. Recomenda-se vivamente a inclusão de controlos positivos e negativos por cada série de determinações de grupo sanguíneo.

Precauções

Exclusivamente para o diagnóstico *in vitro*. Os cartões do Cellbind Screen devem ser armazenados na vertical, a uma temperatura de 2–8°C. Se tal não acontecer, devem ser mantidos numa posição vertical durante cerca de 15 minutos antes de serem utilizados, de forma a permitir que a matriz de gel assente novamente.Eventuais bolhas de ar introduzidas durante o transporte no meio de alta densidade ou na matriz de gel podem ser removidas, na maioria dos casos, girando os cartões selados do Cellbind Screen na centrífuga Cellbind antes da utilização. Os cartões do Cellbind Screen não devem ser utilizados para além do prazo de validade impresso no rótulo dos cartões. Após a leitura dos resultados, os cartões podem ser tapados e armazenados numa posição vertical, a uma temperatura de 2–8°C, durante uma semana. Cloranfenicol a <0,1% é usado como conservante. Não é de todo adequado assumir que os reagentes se encontram isentos de agentes infecciosos. A manipulação e a destruição de cada recipiente devem ser efectuadas com cuidado. A eliminação de resíduos deve ser tratada de acordo com o regulamento do seu laboratório, depois de completado o teste.

Colheita e preparação das amostras

Espécimen:

As amostras de sangue devem ser colhidas com assepsia, com ou sem adição de anticoagulantes. Aconselha-se vivamente a centrifugação dos tubos de colheita de sangue durante 5 minutos a 3000 rcf, antes da colheita das amostras de soro ou plasma. A colheita das amostras de soro ou de plasma deve ser efectuada usando uma pipeta e não vertendo o plasma ou o soro. As amostras de plasma ou de soro devem permanecer isentas de leucócitos, de fragmentos de gel e/ou de resíduos de fibrina, a fim de evitar o bloqueio da matriz de gel. Para a detecção ou identificação de anticorpos eritrocitários, aconselha-se o uso de plasma fresco ou de soro (nas 48 horas seguintes após a colheita). As amostras de soro ou de plasma que não sejam imediatamente testadas podem ser armazenadas durante 48 horas, a uma temperatura de 2–8°C, ou por um período mais prolongado a uma temperatura <–18°C. Aconselha-se a centrifugação das amostras de soro ou de plasma antes do teste, a 3000 rcf, e após 5 minutos de descongelamento, a fim de remover quaisquer precipitados. Para o teste directo de antiglobulina modificado, deve ser utilizado sangue fresco, colhido preferencialmente para tubo com EDTA, de forma a prevenir a cobertura *in vitro* dos eritrócitos com componentes de complemento. O plasma não é indicado para a detecção de anticorpos de ligação ao complemento, dado que os anticoagulantes inibirão a activação do complemento.

Reagentes:
Cellbind Screen (REF K7000): Caixa contendo 48 cartões com 6 microcolunas cada.
Cellbind LISS, 250 ml (REF K7100) , 100 ml (REF K7110): meio de incubação para preparar suspensões de eritrócitos a 0,5%.
Cellbind P2, 2 x 10 ml (REF K7200): Suspensões de eritrócitos reagentes a 0,5% para a detecção de anticorpos eritrocitários.
Cellbind P3, 3 x 10 ml (REF K7210): Suspensões de eritrócitos reagentes a 0,5% para a detecção de anticorpos eritrocitários.
Cellbind P3-P (papaína), 3 x 10 ml (REF K7211): Suspensões de eritrócitos reagentes a 0,5% tratados com papaína para a detecção de anticorpos eritrocitários.
Cellbind ID16, 16 x 3 ml (REF K7230): Suspensões de eritrócitos reagentes a 0,5% para a identificação de anticorpos.
Cellbind ID16-P (papaína), 16 x 3 ml (REF K7231): Suspensões de eritrócitos reagentes a 0,5% tratados com papaína para a identificação de anticorpos.

Materiais:
Centrífuga Cellbind (REF K7302)
Rotor Cellbind (REF K7303)
Incubadora Cellbind (REF K7304)
Dispensador Cellbind (REF K7300)
Estação de trabalho Cellbind (REF K7301)

Suspensões de eritrócitos:
Para a detecção ou identificação de anticorpos, aconselha-se a utilizar as suspensões eritrocitárias de reagente Cellbind a 0,5%. No caso de ser utilizado outro painel celular, deve preparar-se uma suspensão a 0,5% em Cellbind LISS, de acordo com o protocolo de preparação abaixo. Nota: Este protocolo apenas pode ser aplicado a células que não tenham sido tratadas com enzimas. Se for necessário testar com células que não tenham sido tratadas com enzimas, deve utilizar-se Cellbind P3-P (REF K7211) ou Cellbind ID16-P (REF K7231).
Para o autocontrolo e para o teste directo de antiglobulina modificado, deve-se preparar uma suspensão a 0,5% de eritrócitos do paciente em Cellbind LISS. O mesmo se aplica para os eritrócitos do dador ou do paciente na tipagem de sangue e na tipagem cruzada.

Preparação de suspensões eritrocitárias a 0,5%:
11 µl de concentrado de eritrócitos + 2 ml de Cellbind LISS ou
200 µl de eritrócitos reagentes a 3% + 1 ml de Cellbind LISS

Procedimento de utilização da centrífuga Cellbind
Para utilizar a centrífuga Hettich para cartões Cellbind, devem-se efectuar os seguintes passos:
1. Introduzir o rotor Cellbind de acordo com o manual de utilização da Hettich.
2. O rotor é reconhecido pela centrífuga e é automaticamente programado de acordo com o protocolo Cellbind.
3. Para os passos de centrifugação mencionados nos procedimentos de teste Cellbind abaixo indicados, é unicamente necessário pressionar “start” e a centrífuga inicia as rotações conforme os 3 passos seguintes:
   - 0–2 minutos 75 rcf 780 rpm
   - 2–3 minutos 200 rcf 1280 rpm
   - 3–10 minutos 1790 rcf 3840 rpm
4. Terminada a centrifugação pode-se abrir a tampa e retirar os cartões.

Procedimentos do teste
Permitir que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18–25°C). Não utilize os cartões do Cellbind Screen se estes apresentarem bolhas de ar na matriz de gel, selos rompidos ou sinais de secagem (nível de líquido acima da matriz de gel irregular ou inexistente).

Detecção ou identificação de anticorpos
1. Retirar a tira de cobertura do número de colunas necessário.
2. Adicionar 40–50 µl da suspensão de células a testar a 0,5% ao compartimento de incubação.
3. Adicionar o mesmo volume (40–50 µl) de plasma ou soro ao compartimento de incubação.
4. Incubar durante 15 minutos a 37°C na incubadora Cellbind.
5. Introduzir os cartões na centrífuga Cellbind (10 minutos). Os parâmetros de centrifugação foram já programados.
6. Ler as reacções.

Tipagem de antigénios de grupos sanguíneos

1. Retirar a tira de cobertura do número de colunas necessário.
2. Adicionar 40–50 μl da suspensão de eritrócitos a 0,5% no compartimento de incubação.
3. Adicionar 20 μl de reagente da tipagem sanguínea da Sanquin no compartimento de incubação.
   Nota: Está disponível a pedido uma lista dos reagentes de tipagem de sangue Sanquin validados. O uso de qualquer outro tipo de reagente pode conduzir a resultados anormais, pelo que os mesmos devem ser validados pelo utilizador.
4. Introduzir os cartões na centrífuga Cellbind (10 minutos). Os parâmetros de centrifugação foram já programados.
5. Ler as reacções.

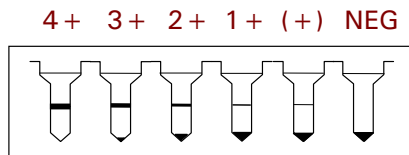
Teste directo de antiglobulina modificado (TDA)

1. Retirar a tira de cobertura do número de colunas necessário.
2. Adicionar uma gota (40–50 μl) da suspensão de eritrócitos a 0,5% do paciente no compartimento de incubação.
3. Introduzir os cartões na centrífuga Cellbind (10 minutos). Os parâmetros de centrifugação foram já programados.
4. Ler as reacções.

Cruzamento

1. Retirar a tira de cobertura do número de colunas necessário.
2. Adicionar 40–50 μl da suspensão de eritrócitos a 0,5% do dador no compartimento de incubação.
3. Adicionar o mesmo volume (40–50 μl) de plasma ou soro do paciente no compartimento de incubação.
4. Incubar durante 15 minutos a 37°C na incubadora Cellbind.
5. Introduzir os cartões na centrífuga Cellbind (10 minutos). Os parâmetros de centrifugação foram já programados.
6. Ler as reacções.

Interpretação

Nas reacções positivas, os eritrócitos serão capturados no topo da matriz de gel. Nas reacções negativas apenas se verá um discreto botão de eritrócitos no fundo da microcoluna. Os padrões de reacção resultantes constam da figura abaixo apresentada:

A quantidade de eritrócitos sensibilizados capturados pelo topo da matriz de gel dependerá de parâmetros como a densidade antigénica dos eritrócitos e o título e a afinidade do anticorpo. Esta quantidade é igualmente determinada pela duração da segunda fase de centrifugação e da força centrifugadora aplicada durante a terceira fase.
Assim, se uma reacção for mais fraca do que 4+, surgirão células também no fundo da microcoluna. O mesmo padrão é visível em reacções de campo misto.

Detecção ou identificação de anticorpos

As reacções positivas indicam a presença de anticorpos eritrocitários no plasma ou no soro. As reacções negativas indicam a ausência de anticorpos eritrocitários. Um autocontrolo positivo indica a presença de auto-anticorpos.

Tipagem de antigénios de grupos sanguíneos

As reacções positivas com reagentes de tipagem de sangue indicam a presença dos antigénios correspondentes nos eritrócitos. As reacções negativas com reagentes de tipagem de sangue indicam que a presença dos antigénios correspondentes nos eritrócitos não pode ser detectada.

Teste directo de antiglobulina modificado (TDA)

As reacções positivas são indicativas da existência de cobertura *in vivo* de eritrócitos com anticorpos e/ou componentes de complemento.

Cruzamento

As reacções positivas são indicativas da incompatibilidade do sangue do dador com o do receptor. As reacções negativas são indicativas da compatibilidade do sangue do dador com o do receptor.

Limitações

Resultados positivos inesperados devidos a: pseudoaglutinação, autoaglutinação, reacção de campo misto, certos fármacos, ou concentrações eritrocitárias demasiado elevadas ou eritrócitos sensibilizados *in vivo* com anticorpos e/ou outros componentes. Resultados inesperadamente negativos ou fracos, devidos a: antigénios fracos, reacção de campo misto ou actividade reduzida dos reagentes. Podem ocorrer falsos resultados positivos, ou negativos, pela presença de bolhas de ar na matriz de gel,contaminação de materiais de teste ou devido a algum desvio das técnicas recomendade. Quando se usam amostras fortemente hemolíticas, podem ocorrer reacções não específicas. Se uma amostra contém resíduos de fibrina, esse facto poderá provocar o sequestro de células não sensibilizadas durante a centrifugação, resultando numa fina linha vermelha no topo da matriz de gel.

Bibliografia

1. Race R.R. and Sanger R.; Blood Groups in Man, 6th ed. Oxford Blackwell Scientific Publishers 1975.
2. Issit P.D.; Applied Blood Group Serology, 3rd ed. Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1985.
3. Daniels G.; Human Blood Groups. Blackwell Science Ltd. 1995.
4. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion In Clinical Medicine, 9th ed. Blackwell, Oxford, 1993.